

# Prevention of asthma in genetically susceptible children (PREVASC)? : a multi-faceted trial on environmental exposure reduction suitable for implementation in general practice

Citation for published version (APA):

Maas, T. (2008). *Prevention of asthma in genetically susceptible children (PREVASC)? : a multi-faceted trial on environmental exposure reduction suitable for implementation in general practice*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20081024tm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2008

## DOI:

[10.26481/dis.20081024tm](https://doi.org/10.26481/dis.20081024tm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

## Summary





## Summary

Asthma is the most common chronic disease in childhood and although it often can be treated successfully, asthma can have major consequences for children's well-being.<sup>1-4</sup> In developed countries a five-fold increase in the prevalence of asthma has been observed between 1980 and 2000. This tendency seems to have reversed thereafter.<sup>5</sup> The most recently observed (2006) prevalence of asthma in children aged five to eight years was approximately 5.7 to 10.5%.<sup>6,7</sup>

In the current thesis the PREVASC study on the primary prevention of asthma in children susceptible to the development of asthma is described. Being a disease that is associated with both genetic and environmental factors<sup>8</sup>, children, however genetically predisposed, may not develop asthma when environmental exposures are adequately reduced. The hypothesis studied in the current research is that asthma might be prevented in children with a genetic predisposition by educating parents about multiple measures for optimising their child's exposure to environmental factors associated with asthma (multi-faceted intervention). The intervention used in the PREVASC study was based on a simultaneous reduction of exposure to environmental factors such as inhalant and food allergens, stimulating breastfeeding, and decreasing the exposure to environmental tobacco smoke. Secondary research questions the PREVASC study focused on were the optimal duration of the intervention offered (short versus extended intervention duration) and the effect of the environmental factors included in the PREVASC intervention on the outcome asthma as measured at age six. Details on the design are described in chapter 3.

**Chapter 2** describes the lack of explanation for what could have caused the rise in prevalence. Assuming that the prevalence may be decreased by reducing exposure to environmental factors, several birth cohort studies are being (or have been) carried out all over the world. Thirteen cohort studies and six randomised controlled trials focusing on the relationship between allergen exposure (solely or in combination with other environmental exposures) and asthma development in children were identified.

Similarities and differences between designs and variable sets are described as basis for carrying out a meta-analysis.<sup>9</sup>

It was concluded that randomised controlled trials are best candidates for inclusion in a meta-analysis. Four trials were evaluated to be particularly suitable because of similarities in their study designs: The Isle of Wight study, the Canadian Allergy and Asthma Project, the CAPS-study and the PREVASC-project. These four all recommend multi-faceted interventions.

In **chapter 3** it is described that the PREVASC study was the first study in the research program on prevention of asthma in children of the Maastricht University. The PREVASC study was also the first (and up until now the only) multi-faceted intervention study carried out in The Netherlands that focused on the primary prevention of asthma in children by intervening on allergen exposure.

A total of 888 Infants were prenatally included in the research program for answering several research questions.<sup>10</sup> By the time of inclusion the mothers were 3-7 months pregnant. Twenty-seven Infants were excluded from the study and 21 dropped out. Of the remaining 840 infants 532 had a first-degree familial predisposition of asthma (high-risk group), whereas a reference group of 308 infants was not predisposed for asthma in the first degree (low-risk group).

The PREVASC study was set up to evaluate the effectiveness of a prenatally started multi-faceted intervention on prevention of asthma. A high-risk group of children was included during pregnancy and they were allocated to either an intervention group (n=222) or a control group (n=221). The infants were followed from the prenatal stage until they reached the age of six years. At this age lung function measurements were carried out. Children were categorised in one of 3 lung function groups (no asthma, possible asthma, current asthma). This categorisation was based on lung function outcome as well as prospectively reported symptoms by parents and general practitioners. The exposure outcome the research focussed upon was determined by standardised measurements and questionnaires completed by parents.

The results of this study are described in chapter 7.

A meta-analysis comparing mono-faceted and multi-faceted interventions is presented in **chapter 4**. The research question posed was whether a simultaneous reduction of multiple exposures will lead to better asthma outcome than single allergen reduction in genetically predisposed children. Some evidence is leading to the assumption that asthma is associated with exposure to allergens.<sup>11, 12</sup> Based on the theoretical consideration that asthma is a multi-factorial disease, it is hypothesised that prevention might only prove effective if most or all relevant environmental factors are simultaneously avoided (multi-faceted intervention).

The effect(s) of mono-faceted and multi-faceted interventions, focussing on preventing asthma and asthma symptoms in children by optimising allergen exposure, were assessed when compared with control interventions.<sup>13</sup>

Eligible studies were screened on relevant results for the current meta-analysis. Studies were included in the analyses when the primary outcome 'current diagnosis asthma' and/or one of the secondary outcomes 'current respiratory symptoms: wheezing, nocturnal cough and dyspnoea' were described. Three multi-faceted and six mono-faceted intervention studies that described their

results at various intervals met the entry criteria. These studies together randomised 3271 children.

Multi-faceted and mono-faceted intervention studies were pooled separately and an indirect comparison of their effects was performed.

The available evidence suggests that multi-faceted interventions characterised by dietary allergen reduction and environmental remediation reduce the likelihood of a current diagnosis of asthma at ages <5 years, whereas the evidence of mono-intervention studies does not indicate a statistically significant difference with control. The results of statistical comparison of outcome of multi-faceted and mono-faceted interventions favoured multi-faceted intervention strategies (diagnosis asthma in children <5 years: Z-score -2.118). Z-test comparison in diagnosis of asthma in children five years and older was not significant between multiple and single interventions (Z-score -1.925).

The effect of multi-faceted interventions on parent reported wheeze was inconsistent and no beneficial effect on nocturnal cough or dyspnoea was found. Mono-faceted interventions were no more effective than controls in the reduction of all outcomes.

Uncertainty remains as to whether multiple interventions are more effective than mono-component interventions. The lack of difference between mono- and multi-faceted interventions on outcome diagnosis asthma at ages five years and older might be real, but on the other hand might have been caused by lack of power (too small number of studies / participants included) or by the difference in study outcome used in the studies compared.

The findings warrant further direct comparison between multiple- and mono-faceted interventions at reducing the prevalence of asthma in children. Since the current meta analyses are not randomised comparisons, we recommend that a new study which assesses both types of interventions is undertaken. There are no studies ongoing to our knowledge in which both intervention strategies are randomly compared. Such a study will be of great importance for shedding new light on preventing the development of asthma in genetically susceptible children.

In **chapter 5** a pilot study on the distribution of the house dust mite allergen on living room floors with smooth coverings is described.

In most studies concerning measurement of exposure to house dust mite allergen in floor dust, the sampling procedure is standardised.<sup>12, 14</sup> For measurement within living rooms at least two sites should be sampled because of unequal distribution.<sup>15</sup> However, there is no consensus about the exact sampling locations.<sup>16</sup>

In this study it is assumed that standardisation of sampling sites surely does matter as daily life activity causes displacement of dust and house dust mite allergen mainly from the middle towards the border of the floor.

As was hypothesised, house dust mite allergen levels sampled in the middle of the room showed to be lower than at the border and the difference was larger when more inhabitants or pets were present (more activity).

It is of further interest whether allergen content of dust should be expressed as  $\text{ng}/\text{m}^2$  or as  $\text{ng}/\text{g}$  of dust. In research the expression of the level of house dust mite allergen as  $\text{ng}/\text{g}$  of dust is used most often. Although it is generally assumed that both types of expression can be interchanged<sup>17</sup>, our research did not underline this assumption. Where a statistically significant difference was detected between middle and border samples when expressed as  $\text{ng}/\text{m}^2$ , no significant difference was detected when overall data were expressed as  $\text{ng}/\text{g}$  of dust. The lack of significance can possibly be explained by the smaller range of house dust mite allergen levels when expressed as  $\text{ng}/\text{g}$  of dust. We concluded that house dust mite allergen content expressed as  $\text{ng}/\text{g}$  of dust and  $\text{ng}/\text{m}^2$  therefore cannot obviously be interchanged. In households where small amounts of dust are present, but in these small amounts the concentration of allergen is high (high exposure when expressed as  $\text{ng}/\text{g}$  of dust), the actual exposure will be low on the contrary. We therefore state that expression of exposure to house dust mite allergen will be better estimated when presentation as  $\text{ng}/\text{m}^2$  is used. This will be especially important in studies in which house dust mite allergen exposure is a possible determining factor.

The hygiene hypothesis assumes infections in early childhood keep the developing immune system from becoming unbalanced and therefore from developing allergic diseases.<sup>18</sup> In **chapter 6** this popular hypothesis is evaluated by making use of data collected by parents and general practitioners of the 443 children included in the PREVASC-cohort.

The number of episodes of common cold and diarrhoea associated with fever were the parental reported infection variables used as independent predictors. Outcome variables were a general practitioners' diagnosis of asthma, asthmatic symptoms at age four to six and total and specific immune globulin E (IgE) at age six.

The results showed that the more episodes of common cold were reported, the lower the total IgE level measured. Episodes of diarrhoea associated with fever showed to be related to a decrease of the specific IgE level for house dust mite allergens. As IgE is an important diagnostic factor for allergy<sup>19</sup>, the results of the current analyses suggest that infections might play a preventive role in the development of allergy.

The analyses however showed NOT to support the hypothesis that infections teach the developing immune system to arm itself either against the development of asthma or asthma-like symptoms in children at high risk of developing asthma.

It might be possible that no relationship between asthma diagnosis or asthma symptoms, common cold and diarrhoea was found because the symptoms of these common infections as reported by the parents were not suitable measures for infection load.

The results of the PREVASC study-intervention are described in **chapter 7**. The children that could be followed up until the age of six were invited to participate in lung function measurements. This accounted for 219 children in the intervention group (IG) and 215 children in the control group (CG).

The intervention offered was focussed on a simultaneous optimisation of multiple environmental exposures such as breast feeding, food allergens, inhalant allergens and environmental tobacco smoke. The intervention used was suitable for direct implementation in general practice.

The IG was divided into two subgroups: a short IG in which children received the intervention from pregnancy to 2 years of age ( $n=108$ ), and an extended IG ( $n=111$ ) in which children received the intervention up until six years of age.

Primary outcome of the study was asthma diagnosis at age six categorised by a predefined algorithm (no asthma, possible asthma or current asthma). The categorisation was based on lung function outcome as well as health reports of general practitioners and parents.

For answering the primary research question the IG as a whole was compared with the CG. Comparisons of the separate IG subgroups with the CG were carried out for answering the secondary research question on the intervention duration.

A multiple logistic regression analysis was carried out to assess the influence of individual intervention elements on the development of asthma.

The PREVASC study intervention resulted in a statistically significant reduction of exposure of the IG to food allergens at six months ( $p<0.001$ ) and inhalant allergens at age four (Der p1  $p=0.012$ , Fel d1  $p=0.037$ , Can f1  $p=0.043$ ) but no differences were observed where the exposure to pet ( $p=0.111$ ) and environmental tobacco smoke ( $p=0.786$ ) were evaluated at six years of age.

Although the exposure outcome showed to be significantly reduced in the IG, the clinical outcome was not shown to be statistically different between groups. Neither the IG as a whole (0.645), nor the separate IGs ( $p=0.491$ ,  $p=0.853$ ) showed to have different clinical outcome as compared to the CG.

Therefore it was concluded that the PREVASC intervention was not effective in reducing the development of asthma in children at risk and it was not possible to define optimal intervention duration. The room for improvement for reducing the exposure to house dust mite allergen and exposure to environmental tobacco smoke was limited, as the baseline exposure to these factors showed to be very low. Aside from these observations lack of compliance might have played a part in the absence of clinical effectiveness, especially for the



breastfeeding promoting intervention and the house dust mite allergen reducing intervention.

The analysis on the influence of the individual intervention elements (secondary research question 2) revealed that breastfeeding and house dust mite allergen exposure were of particular importance in the PREVASC intervention. These particular parts of the intervention however showed not to have resulted in a desirable exposure outcome.

The only two comparable studies were carried out in Canada and the United Kingdom and seemed to support the hypothesis that multi-faceted allergen reduction might prevent the development of asthma in susceptible children. The discrepancy between these studies and the present study might be explained by the low number of families complying with our recommendations. Possibly the results of our intervention would have been more successful when we would have put more effort in stimulating compliance with the use of the house dust mite impermeable encasings and the promotion of breastfeeding.

A *general discussion* of the present thesis is provided in **chapter 8**. In this chapter the results of the PREVASC-study, the methodological considerations, added value of the current thesis, conclusions and recommendations for clinical practice and further research are described.

*What could be concluded from the current thesis?*

1. The PREVASC trial did not result in reduction of asthma in susceptible children. Aside from the possibility that reducing environmental allergen exposure truly does not prevent asthma development, other explanations might be:
  - a. Low levels of house dust mite allergen and environmental tobacco smoke exposure (low room for improvement);
  - b. The fact that the PREVASC intervention was aimed at implementation in real life and thereby was less focused on enhancing compliance.
2. Although the current trial did not support the results of the meta-analyses carried out in this thesis, asthma seems to be best prevented in high-risk children by intervening on multiple allergen exposures simultaneously.
3. Post-hoc analysis of PREVASC data has indicated that asthma might be prevented when a child is exposed to low levels of house dust mite allergen exposure. Also breastfeeding seemed to have a preventive effect. Other exposures did not indicate to play any role in the development of asthma in susceptible children.
4. PREVASC-data do not supply evidence for the assumption that infections in susceptible children can protect against the development of asthma and atopy.

### *What this research adds?*

The current trial will not change the guidelines on primary prevention of asthma in susceptible children. What the PREVASC trial has taught us is that the trial intervention cannot be recommended for use in general practice in the Netherlands. Country specific circumstances (e.g. low house dust mite allergen exposure levels in the Netherlands) as well as the fact that our intervention was aimed at implementation in real life and thereby less focused on enhancing compliance might have played a role in the lack of clinical effectiveness. This resulted in insufficient reduction of exposure to environmental factors.

If the multi-faceted intervention is optimised with improved compliance, the outcome will give more decisive answers on the question if asthma can be prevented in susceptible children by reducing environmental exposures. The study of Gijsbers et al. already showed how optimising an intervention results in increased compliance.

We therefore do advise to perform a study aimed at prevention of asthma in susceptible children by using an optimised intervention on reduction of environmental exposures preferably in multiple countries with differing room for improvement. This type of research is necessary for the generalisation of results.

### *Recommendations for clinical practice*

Although the current trial did not support the results of the meta-analyses, asthma seems to be best prevented in high-risk children by intervening on multiple allergen exposures simultaneously. We therefore recommend for primary care providers to advise parents of children susceptible to develop asthma to create an overall low allergen environment for their children.

### *Recommendations for future research*

A large longitudinal study might be set up in which the following research question will be answered:

- ✓ Is a multi-faceted allergen reducing intervention on primary prevention of asthma in susceptible children more effective than its mono-faceted counterpart?

Performing a multi-faceted intervention as well as several mono-faceted interventions on the reduction of (food and inhalant) allergen exposures in which several countries with different baseline exposure levels co-operate is recommended. Stimulating compliance to the interventions used would have to receive enough attention.

In a study like this, multi-faceted and mono-faceted interventions on the reduction of allergen exposure should be randomly compared. Only when such

a study has been carried out more definite conclusions can be drawn concerning the possibility and/or preference of intervention types (mono-faceted or multi-faceted) in the primary prevention of asthma in children at risk.

## References

1. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000; 82 Suppl 2:II2-5.
2. Blackman JA, Gurka MJ. Developmental and behavioural comorbidities of asthma in children.
3. Dahl R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Respir Med* 2006;100:1307-17.
4. van Gent R, van Essen LE, Rovers MM, Kimpen JL, van der Ent CK, de Meer G. Quality of life in children with undiagnosed and diagnosed asthma. *Eur J Pediatr* 2007; 166:843-8.
5. van Schayck CP, Smit HA. The prevalence of asthma in children: a reversing trend. *Eur Respir J* 2005;26:647-50.
6. Bjerg-Backlund A, Perzanowski MS, Platts-Mills T, Sandstrom T, Lundback B, Ronmark E. Asthma during the primary school ages--prevalence, remission and the impact of allergic sensitization. *Allergy* 2006;61:549-55.
7. Hermann C, De Fine Olivarius N, Host A, Begtrup K, Hollnagel H. Prevalence, severity and determinants of asthma in Danish five-year-olds. *Acta Paediatr* 2006;95:1182-90.
8. Martinez FD. Complexities of the genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:S117-22.
9. Maas T, Dompeling E, Schayck van CP, Muris J, Schönberger H, Wesseling G, Platts-Mills TAE, Knottnerus JA. Birth cohort studies on asthma development. *Pediatr Asthma, Allergy, Immunol* 2005;18:201-15.
10. Kuiper S, Maas T, van Schayck CP, Muris JW, Schönberger HJ, Dompeling E, Gijsbers B, van Weel C, Knottnerus JA. The primary prevention of asthma in children study: design of a multifaceted prevention program. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:321-31.
11. Boner AL, Niero E, Antolini I, Valletta EA, Gaburro D. Pulmonary function and bronchial hyperreactivity in asthmatic children with house dust mite allergy during prolonged stay in the Italian Alps (Misurina, 1756 m). *Ann Allergy* 1985;54:42-5.
12. Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Champman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89: 1046-60.
13. Maas T, Kaper J, Sheikh A, Knottnerus JA, Wesseling G, Dompeling E, Muris JWM, van Schayck CP. Mono and multifaceted allergen reduction interventions for preventing asthma in children at high risk of developing asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2007.
14. Luczynska CM. Identification and quantification of mite allergens. *Allergy* 1998; 53:54-7.
15. Marks GB, Tovey ER, Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Variability and repeatability of house dust mite allergen measurement: implications for study design and interpretation. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1190-7.
16. Hill MR. Quantification of house-dust-mite populations. *Allergy* 1998;53:18-23.
17. Custovic A, Taggart SC, Niven RM, Woodcock A. Evaluating exposure to mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:134-5.
18. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299:1259-60.
19. (CVZ) CVZ. Immunoglobuline E (IgE) / Allergeen-specifiek IgE. In: Diagnostisch Kompas; 2003.



## Samenvatting





## Samenvatting

### Algemene inleiding

Astma is de meest voorkomende chronische ziekte bij kinderen en hoewel astma over het algemeen succesvol behandeld kan worden, is er met name bij kinderen voldoende reden om er alles aan te doen astma te voorkomen. Het belang van preventie van astma is groot aangezien de gevolgen van astma voor een kind vaak erg beangstigend zijn.<sup>1-3</sup> Astma heeft bij kinderen dan ook grote consequenties voor de ervaren kwaliteit van leven.<sup>4</sup>

Het voorkomen van astma in westerse landen is enorm gestegen in de periode van 1980 tot 2000 maar lijkt te zijn gedaald in de periode na 2000.<sup>5</sup> De laatste metingen van de gegevens betreffende het voorkomen van astma in ontwikkelde landen werden in 2006 gedaan in Scandinavië. In deze onderzoeken werd aangetoond dat het aantal patiënten met astma in de leeftijd van vijf tot acht jaar rond de 5.7 tot 10.5% lag.<sup>6,7</sup>

In dit proefschrift wordt de PREVASK studie beschreven, een onderzoek naar de preventie van astma bij kinderen met een verhoogde kans deze ziekte te ontwikkelen. Het ontstaan van astma wordt geassocieerd met zowel erfelijke factoren als omgevingsfactoren<sup>8</sup>, en aangenomen wordt dat kinderen met een erfelijke aanleg astma te ontwikkelen mogelijk geen astma zullen krijgen als omgevingsfactoren worden geoptimaliseerd. Dit laatste heeft geleid tot de hypothese van het PREVASK onderzoek: *Astma kan voorkomen worden bij familiaal belaste kinderen door de ouders voor te lichten over manieren waarop ze de blootstelling van hun kind aan meerdere omgevingsfactoren simultaan kunnen optimaliseren.* De interventie die gehanteerd werd in het PREVASK onderzoek is gebaseerd op de vermindering van de blootstelling aan omgevingsfactoren als inhalatieallergenen, voedingsallergenen en sigarettenrook evenals het stimuleren van het geven van borstvoeding (meervoudige interventie). Secundaire onderzoeksvragen van het PREVASK onderzoek waren gericht op de optimale duur van de interventie (kortdurende of uitgebreide interventie) en de mate van invloed van elk van de omgevingsfactoren waarop geïntervenieerd werd, op de uitkomstmaat astma. Details van het design van het PREVASK onderzoek zijn beschreven in hoofdstuk 3.

### *Geboortecohort studies naar de preventie van astma bij kinderen*

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven dat de oorzaak van de stijging van de prevalentie van het aantal astma gevallen niet duidelijk is. Er vanuit gaande dat de blootstelling aan allergenen een belangrijke rol spelen zijn verschillende geboortecohort studies opgezet (of zijn reeds afgerond) over de hele wereld.



Dertien cohort studies en zes gerandomiseerd gecontroleerde trials gericht op de relatie tussen de blootstelling aan allergenen (enkelvoudig of in combinatie met andere blootstellingen) en de ontwikkeling van astma werden geïdentificeerd.

Overeenkomsten en verschillen tussen de designs en sets van variabelen werden beschreven als voorbereiding op het uitvoeren van een zogenoemde meta-analyse.<sup>9</sup> In een meta-analyse worden de resultaten van verschillende onderzoeken samengevoegd waardoor de onderzoekspopulatie groter wordt en de uitkomsten meer kracht krijgen.

Conclusie was dat gerandomiseerd gecontroleerde onderzoeken (Isle of Wight studie, Canadese allergie en astma bij kinderen studie, CAPS studie en de PREVASK studie) de beste kandidaten zijn voor opname in een meta-analyse. Deze onderzoeken maken namelijk alle drie gebruik van een meervoudige interventie.

### *Onderzoeksprogramma naar preventie van astma bij kinderen*

In **hoofdstuk 3** is beschreven dat de PREVASK studie de eerste studie is binnen het onderzoeksprogramma naar de preventie van astma bij kinderen, dat wordt uitgevoerd door onderzoekers van de Universiteit Maastricht. Deze studie is tevens de eerste (en tot nu toe de enige) Nederlandse meervoudige interventie studie gericht op de primaire preventie van astma bij kinderen waarbij wordt ingegrepen in de blootstelling aan omgevingsfactoren.

In het volledige onderzoeksprogramma werden in totaal 888 kinderen prenataal ingesloten om de verschillende onderzoeksvragen te beantwoorden.<sup>10</sup> Op het moment van insluiting waren de moeders 3-7 maanden zwanger. Zevenentwintig kinderen werden uitgesloten en 21 vielen uit op enig moment na insluiting. De gegevens van 840 kinderen konden worden gebruikt voor beantwoording van de onderzoeksvragen. Van deze kinderen was de grootste groep erfelijk belast voor het ontwikkelen van astma op enig moment in hun leven (532 kinderen, hoogrisico groep). Een groep van 308 kinderen had een laag risico om astma te ontwikkelen.

De PREVASK studie is opgezet voor de evaluatie van de effectiviteit van een prenataal gestarte meervoudige interventie. Kinderen met een verhoogd risico om astma te ontwikkelen op grond van voorkomen van astma in het gezin werden gevolgd vanaf de zwangerschap. Deze kinderen werden op grond van toeval ingedeeld in een interventiegroep (IG 222 kinderen) waaraan een meervoudige interventie werd aangeboden, of een controlegroep (CG 221 kinderen) waarin de reguliere zorg tijdens zwangerschap en kinderleeftijd werd gehanteerd. Deelnemende kinderen werden gevolgd totdat zij de leeftijd van zes jaar bereikten. Op deze leeftijd kregen ze een longfunctiemeting en werden ze ingedeeld in een van de drie astmagroepen (geen astma, mogelijk astma, zeker astma). Deze categorisering werd gebaseerd op de uitkomst van de

longfunctiemeting en symptomen die prospectief longitudinaal gerapporteerd werden door ouders en huisartsen. De uitkomsten van de blootstelling aan de omgevingsfactoren waarop het onderzoek zich richtte werden met behulp van gestandaardiseerde metingen geobjectiveerd en gerelateerde factoren (gedrag) werden gerapporteerd door de ouders in vragenlijsten.

De resultaten van deze studie zijn beschreven in hoofdstuk 7.

### *Meta-analyse*

**Hoofdstuk 4** beschrijft een meta-analyse uitgevoerd met als doel te verduidelijken of astma, een ziekte die wordt veroorzaakt door zowel erfelijke- als omgevingsfactoren<sup>8</sup>, voorkomen kan worden door een eenvoudige allergeen reducerende interventie aan te bieden aan kinderen met een hoog risico op het ontwikkelen van astma. Er zijn duidelijke aanwijzingen dat prikkelende stoffen (allergenen) geassocieerd zijn met het ontstaan van astma.<sup>11,12</sup> Onderzocht is in de huidige studie of meervoudige interventies, interventies gericht op simultane optimalisering van meerdere prikkelende factoren, vaker leiden tot een preventief effect.

Om deze aanname te toetsen werden de samengevoegde resultaten van eenvoudige interventiestudies en meervoudige interventiestudies statistisch getoetst.<sup>13</sup> De studies waren allen gericht op optimalisering van blootstelling aan allergenen ter voorkoming van astma en astmasymptomen bij kinderen met een verhoogd risico op het ontwikkelen van astma.

Om in aanmerking te komen voor opname in deze meta-analyse moesten studies minimaal het eindpunt astma getoetst hebben bij kinderen met een verhoogd risico op het ontstaan van astma. Indien gerapporteerd, werden ook gegevens met betrekking tot astma symptomen geëvalueerd (piepen, nachtelijk hoesten, kortademigheid). Drie meervoudige interventie studies, gericht op optimalisering van blootstelling aan meerdere factoren (voedings- en inhalatieallergenen), en zes eenvoudige interventiestudies (reductie van blootstelling aan een enkel allergeen), voldeden aan de criteria. Deze studies hadden gezamenlijk 3271 deelnemers.

Studies van de beide interventietypen werden groepsgewijs geanalyseerd. Vervolgens werd een statistische vergelijking gemaakt van de gepoolde resultaten van primaire preventie studies die gebruik maakten van een meervoudige of een eenvoudige interventie.

Meervoudige interventies verminderden de kans op het ontstaan van astma bij kinderen in de leeftijd van twee tot vijf jaar significant succesvoller. Effecten van meervoudige interventies op de diagnose astma in de leeftijd van vijf jaar en ouder bleken echter niet significant te verschillen van de effecten van eenvoudige interventies. Deze uitkomst zou correct kunnen zijn maar het is niet onwaarschijnlijk dat de afwezigheid van significantie veroorzaakt is doordat

er te weinig studies (n=2 per interventietype) en/of een te klein aantal proefpersonen konden worden vergeleken. Daarnaast werden er in de beide typen interventiestudies verschillende manieren van diagnosestelling gehanteerd die de vergelijking bemoeilijkten.

De effecten van meervoudige interventiestudies op de preventie van piepen waren niet consistent en deze interventies bleken niet effectief in het voorkomen van nachtelijk hoesten of kortademigheid. Enkelvoudige interventies bleken in geen geval effectiever dan usual care. Geconcludeerd werd dat er geen statistisch significant verschil kon worden aangetoond tussen de resultaten van beide groepen interventies met betrekking tot het voorkomen van astma symptomen.

Hoewel meervoudige interventies effectiever leken dan enkelvoudige interventies bij de preventie van astma blijft er onzekerheid over deze uitkomst. De analyses die gedaan zijn in het huidige proefschrift waren indirect van aard, wat betekent dat beide interventietypen niet in één en hetzelfde onderzoek werden uitgevoerd. Gevolg hiervan zijn mogelijke verschillen in basisblootstelling, insluitcriteria en uitkomstparameters. De resultaten van de uitgevoerde meta-analyse zijn echter een duidelijke indicatie dat meervoudige interventies bij astmapreventie mogelijk effectiever zijn dan enkelvoudige interventies. Een krachtiger uitspraak zou gedaan kunnen worden wanneer een nieuw onderzoek opgezet wordt waarin beide interventietypen worden opgenomen. Een onderzoek waarin de effecten van een meervoudige interventie én enkelvoudige interventies gericht op allergeenreductie gerandomiseerd worden vergeleken, is tot op heden niet uitgevoerd. Dergelijk onderzoek zou naar ons inzicht van groot belang zijn om duidelijkheid te krijgen over de beste manier om astma en astmasymptomen te voorkómen door de blootstelling aan allergenen te optimaliseren bij kinderen met een verhoogd risico.

### *Verspreiding van huisstofmijt allergeen over gladde vloeren*

Eén van de omgevingsfactoren die verband lijkt te houden met het ontstaan van astma is de blootstelling aan huisstofmijtallergeen. **Hoofdstuk 5** behandelt de studie waarin de verspreiding van huisstofmijtallergeen in woonkamers met gladde vloeren onderzocht werd. Bij de meeste studies waarin de blootstelling aan huisstofmijtallergeen in vloerstof wordt gemeten, is de methode van meting gestandaardiseerd.<sup>14, 15</sup> Daarbij valt echter op dat er geen uniformiteit is in de plaatsen waar de metingen verricht worden.<sup>16</sup> Wel is bekend dat de spreiding van huisstofmijtallergeen niet gelijkmatig verdeeld is over de vloer en dat daarom minimaal twee plekken op de vloer gemonsterd zouden moeten worden.<sup>17</sup>

Aangenomen werd dat de huisstofmijtallergenen voornamelijk van het midden naar de rand van de kamer worden verplaatst door activiteit in de woonkamer.

Om deze aanname te toetsen werden er stofmonsters genomen in woonkamers met gladde vloeren op locaties in het midden en de zijkant van de kamer. Uit de stofmonsters die afgenomen werden bleek inderdaad dat de hoeveelheden huisstofmijtallergeen lager waren in het midden van de woonkamer ten opzichte van de hoeveelheden aanwezig aan de randen. Daarnaast bleek dat verplaatsing van de hoeveelheden huisstofmijtallergeen meer voorkwam in huishoudens waarin meerdere huisgenoten of huisdieren aanwezig waren (meer activiteit).

Naast deze waarneming is het interessant te bediscussiëren of de hoeveelheden huisstofmijtallergeen beter uitgedrukt zouden kunnen worden in  $\text{ng/m}^2$  of als  $\text{ng/g}$  stof. Over het algemeen wordt bepleit dat beide manieren van uitdrukken vergelijkbaar zouden zijn.<sup>18</sup> Echter, in dit onderzoek werd wel een statistisch significant verschil gevonden tussen stofmonsters genomen in het midden en monsters genomen aan de rand van de woonkamer wanneer de uitslagen werden uitgedrukt in  $\text{ng/m}^2$ . Er bleek geen verschil te zijn tussen de verschillende locaties van meting wanneer de uitkomsten uitgedrukt werden in  $\text{ng/g}$  stof.

Een mogelijke verklaring voor deze waarneming kan zijn dat de variatie in huisstofmijtallergeen hoeveelheden kleiner is wanneer deze zijn uitgedrukt als  $\text{ng/g}$  stof. Hoewel in wetenschappelijk onderzoek meestal de uitdrukking als  $\text{ng/g}$  stof wordt gehanteerd zijn wij van mening dat deze allergeen hoeveelheden - in onderzoek waarin dit allergeen een belangrijke voorspellende waarde wordt toegedicht - beter uitgedrukt kunnen worden als  $\text{ng/m}^2$ . In woonkamers waarin weinig stof ligt, kan per gram stof namelijk wel een hoge concentratie allergeen aanwezig zijn, terwijl in dit geval de blootstelling in werkelijkheid laag blijft. Wanneer uitgedrukt in  $\text{ng/g}$  stof zou kunnen worden gesuggereerd dat er een hoge concentratie werd gemeten.

### *Preventief effect van infecties op jonge leeftijd*

De hygiëne hypothese is een zeer populaire theorie dat infecties die voorkomen tijdens het jonge leven van kinderen het nog in ontwikkeling zijnde immuunsysteem beschermen tegen het ontstaan van allergie en astma.<sup>19</sup> In **hoofdstuk 6** wordt deze hypothese geëvalueerd door gebruik te maken van data die verzameld zijn door de ouders en huisartsen van de kinderen die deelnamen aan het PREVASK onderzoek.

Het aantal episodes van verkoudheid en diarree geassocieerd met koorts, waren de infectievariabelen die gebruikt werden. De uitkomstvariabelen waren de door de huisartsen gerapporteerde diagnose astma en astma symptomen in de leeftijd van vier tot zes jaar en het totaal en specifiek Immunglobuline E (IgE) op zes jarige leeftijd. IgE is een belangrijke factor die gebruikt wordt bij de diagnostiek van allergie.<sup>20</sup>

Uit de analyses bleek dat hoe meer episodes van verkoudheid werden gerapporteerd door de ouders, hoe lager het IgE niveau was dat werd gemeten in het bloed van de kinderen. Episodes van diarree met koorts bleken ditzelfde effect te hebben op het specifiek IgE gericht op huisstofmijt allergenen.

Conclusies die we konden trekken uit de uitgevoerde analyses zijn dat infecties het ontstaan van allergie mogelijk voorkomen maar dat een dergelijk preventief effect NIET geobserveerd werd als het gaat om het ontstaan van astma of astma symptomen bij kinderen met een hoog risico hierop.

Mogelijk is het uitblijven van een preventief effect van infecties op astma en astma symptomen in dit onderzoek er het gevolg van dat we de gerapporteerde en niet de objectief vastgestelde infecties hebben gebruikt in de analyses. Het is daarnaast ook mogelijk dat er te weinig waarnemingen waren waarop de conclusies gebaseerd konden worden (power probleem).

### *Resultaten van de PREVASK interventie*

De resultaten van de PREVASK interventie zijn beschreven in **hoofdstuk 7**. De aanname dat astma voorkomen zou kunnen worden bij familiaal belaste kinderen door meerdere omgevingsfactoren simultaan te optimaliseren werd getoetst.

Naast de effectiviteit van de interventie op de mate van blootstelling aan de omgevingsfactoren waarop de interventie zich richtte, werd de klinische effectiviteit zoals gemeten op vier en zesjarige leeftijd beschreven (hoofdvraagstelling).

Resultaten van de secundaire onderzoeksvraagstellingen gericht op 1) de optimale interventieduur en 2) de invloed van de individuele omgevingsfactoren waarop de interventie was gericht (borstvoeding, voedingsallergenen, inhalatieallergenen, sigarettenrook) werden eveneens vermeld.

De interventie die aangeboden werd was gericht op de simultane optimalisering van de blootstelling aan de omgevingsfactoren borstvoeding, voedselallergenen, inhalatieallergenen en passief roken. De interventie was zo opgezet dat deze direct geïmplementeerd zou kunnen worden in de huisartspraktijk.

Tot hun tweede levensjaar kregen alle kinderen in de interventiegroep (IG) dezelfde interventie aangeboden en vanaf dat moment werd een splitsing gemaakt, wederom op grond van het lot, in een lange IG en een korte IG. Aan gezinnen in de korte IG (n=108) werden vanaf twee jaar geen maatregelen meer geadviseerd die de blootstelling aan de omgevingsfactoren zouden optimaliseren. De gezinnen in de lange IG (n=111) daarentegen kregen nog steeds adviezen over de optimalisering van de blootstellingen waarop het onderzoek zich richtte. Aan gezinnen in de controlegroep (CG) werd de reguliere zorg aangeboden.

Die kinderen die bleven deelnemen tot hun zesde levensjaar werden uitgenodigd om longfunctiemetingen te laten verrichten (mede) op grond waarvan kon worden vastgesteld of ze astma hadden ontwikkeld of niet. Het aantal kinderen, dat deelnam tot hun zesde levensjaar was 219 in de IG and 215 in de CG (>90% van de initieel ingesloten kinderen).

De primaire uitkomstmaat was de diagnose astma zoals gemeten op zes jarige leeftijd. Nadat de longfunctiemetingen uitgevoerd waren, werden de kinderen gecategoriseerd in een van de drie astmagroepen (geen astma, mogelijk astma, zeker astma) door een vooraf opgesteld algoritme. De categorisering vond plaats op grond van de longfunctie-uitslagen, prospectief geregistreerde gezondheidsgegevens gerapporteerd door de huisartsen en door de ouders (gezondheidsvragenlijsten).

De groepen die op grond van hun astmastatus werden vergeleken voor beantwoording van de hoofdvraagstelling waren de IG in zijn totaliteit en de CG. Daarnaast werd de CG vergeleken met de beide afzonderlijke interventiegroepen voor beantwoording van de secundaire vraagstelling over de optimale interventieduur.

Een logistische regressie analyse werd uitgevoerd voor beantwoording van de secundaire vraagstelling over de invloed van de afzonderlijke omgevingsfactoren die onderdeel waren van de interventie, op de ontwikkeling van astma zoals gemeten op zes jarige leeftijd.

De resultaten van het PREVASK onderzoek toonden aan dat de interventie, in vergelijking tot de CG gegevens, succesvol was in het reduceren van de blootstelling aan voedselallergenen en inhalatieallergenen. De interventie gericht op vermindering van de blootstelling aan huisdieren en sigarettenrook was niet effectief.

Hoewel de blootstelling voor een belangrijk deel effectief was gebleken, werden er geen statistisch significante verschillen waargenomen op grond van de uitkomstmaat astma bij vergelijking van de studiegroepen (IGtotaal versus CG, IGkort versus CG, IGlang versus CG).

We hebben dan ook moeten concluderen dat de interventie niet effectief was in het reduceren van de ontwikkeling van astma bij kinderen die hierop vanwege hun familiale achtergrond een hoger risico hadden. De interventie werd niet in voldoende mate gevolgd door de ouders waardoor de vraagstelling betreffende de optimale interventieduur niet beantwoord kon worden.

De blootstelling aan huisstofmijtallergeen en sigarettenrook bleken reeds bij start van het onderzoek erg laag te zijn. Hierdoor was de ruimte voor verbetering voor deze interventie onderdelen klein / onvoldoende. Behalve deze waarneming bleek er ook sprake te zijn van onvoldoende therapietrouw bij het uitvoeren van de borstvoedingstimulerende interventie en de huisstofmijt allergeen reducerende interventie.

De resultaten van de vraagstelling gericht op de effectiviteit van de individuele interventie elementen (secundaire vraagstelling 2) lieten zien dat juist deze factoren van belang waren in de preventie van astma bij kinderen met een verhoogd risico om astma te ontwikkelen.

In Engeland en Canada zijn vergelijkbare studies uitgevoerd die de hypothese dat meervoudige interventies gericht op optimalisering van omgevingsfactoren de ontwikkeling van astma zou voorkomen WEL onderschrijven. Mogelijk heeft het gebrek aan voldoende ruimte voor verbetering van de huisstofmijt allergeen blootstelling en de afwezigheid van voldoende therapietrouw met de borstvoedings- en hoezenadviezen geleid tot het verschil in uitslag tussen de PREVASK studie en de overige meervoudige interventiestudies. Mogelijk zouden de resultaten van de PREVASK interventie de hypothese wél hebben kunnen bewijzen als er meer aandacht was gegeven aan het stimuleren van de interventietrouw / therapietrouw.

## Slotbeschouwing

Een slotbeschouwing betreffende de onderwerpen opgenomen in het huidige proefschrift is beschreven in **hoofdstuk 8**. In dit hoofdstuk worden de resultaten van de PREVASK-studie beschreven. Er wordt een kritische blik geworpen op de methodologie en de toegevoegde waarde van het huidige proefschrift en ook de conclusies en aanbevelingen voor de huisartspraktijk en verder onderzoek krijgen aandacht.

*Wat kan er geconcludeerd worden uit het onderzoek gepresenteerd in het huidige proefschrift?*

1. Het PREVASK onderzoek heeft niet geresulteerd in de preventie van astma bij familiaal belaste kinderen. Dit resultaat zou kunnen betekenen dat astma niet voorkomen kan worden door het optimaliseren van omgevingsfactoren. Gezien de positieve resultaten van vergelijkbare onderzoeken bestaat ook de mogelijkheid dat onderstaande factoren een belangrijke rol hebben gespeeld bij het uitblijven van een preventief effect:
  - a. Gebrek aan voldoende ruimte voor verbetering van de niveaus van blootstelling aan huisstofmijtallergeen en sigarettenrook;
  - b. Het feit dat de PREVASK-interventie vooral gericht was op implementatie in de dagelijkse huisartspraktijk en niet voldoende gericht was op bevordering van trouw aan de interventiemaatregelen.
2. Hoewel het PREVASK onderzoek de resultaten van de uitgevoerde meta-analyse die wordt beschreven in het huidige proefschrift niet bevestigt, lijkt astma het beste voorkomen te kunnen worden bij hoogrisico kinderen door de blootstelling aan verschillende allergenen gelijktijdig te reduceren.
3. Posthoc analyses van de PREVASK gegevens hebben duidelijk gemaakt dat astma voorkomen kan worden door de blootstelling aan huisstofmijtallergeen

te reduceren en ook borstvoeding bleek een preventief effect te hebben op de ontwikkeling van astma bij familiaal belaste kinderen.

4. PREVASK gegevens leiden niet tot bewijs voor de aanname dat infecties bij familiaal belaste kinderen het ontstaan van astma zouden kunnen voorkomen.

#### *Wat voegt dit onderzoek toe?*

Het PREVASK onderzoek draagt niet bij aan enige verandering van richtlijnen aangaande de primaire preventie van astma bij hoogrisico kinderen. Wat de PREVASK studie ons heeft geleerd is dat de gebruikte onderzoeksinterventie niet kan worden aanbevolen voor gebruik in de huisartspraktijk in Nederland ter voorkoming van astma bij kinderen.

Het is aannemelijk dat omstandigheden specifiek voor de Nederlandse situatie (met name de lage blootstelling aan huisstofmijt allergeen) een rol hebben gespeeld in het gebrek aan effectiviteit van de interventie. De onderzoeksinterventie was gericht op implementatie in de reguliere huisartspraktijk en daardoor minder gericht op het bevorderen van de therapietrouw. Dit kan een rol hebben gespeeld in het gebrek aan klinische effectiviteit. Dit alles heeft mogelijk geleid tot een te lage reductie van blootstelling aan omgevingsfactoren.

De studie uitgevoerd door Gijsbers en collega's heeft reeds aangetoond hoe een geoptimaliseerde interventie resulteert in een verhoogde therapietrouw. Om deze reden adviseren wij om de PREVASK studie-interventie te optimaliseren ter bevordering van de therapietrouw waarin bij voorkeur meerdere landen met een verschillende blootstelling, en dus verschillende ruimte voor verbetering aan de te onderzoeken omgevingsfactoren, samenwerken. Dit type onderzoek is van groot belang voor de generaliseerbaarheid van de resultaten van het preventieve astmaonderzoek.

#### *Aanbevelingen voor de klinische praktijk*

Hoewel de PREVASK studie de resultaten van de in dit proefschrift uitgevoerde meta-analyse niet onderschrijft, lijkt het aannemelijk dat astma het beste voorkomen kan worden door gebruik te maken van een meervoudige interventie waarbij allergeenblootstellingen simultaan gereduceerd worden. Kinderen die opgroeien in een omgeving waarin zij blootgesteld worden aan lage allergeenwaarden lijken een kleiner risico te lopen astma te ontwikkelen.

#### *Aanbevelingen voor toekomstig onderzoek*

Een grote langlopende studie waarin de onderstaande onderzoeksvraag wordt beantwoord wordt aanbevolen:



- ✓ Heeft een meervoudige allergeenreducerende interventie inderdaad, zoals de meta-analyse impliceert, de voorkeur boven een enkelvoudige allergeenreducerende interventie ter voorkoming van astma bij kinderen met een verhoogd risico astma te ontwikkelen?

Aanbevolen wordt een onderzoek uit te voeren waarin zowel een meervoudige interventie als ook verschillende enkelvoudige interventies gericht op vermindering van blootstelling aan allergenen worden uitgevoerd. Van groot belang is dat aan een dergelijke studie meerdere landen met verschillende allergeen basisniveaus bijdragen zodat er voldoende ruimte voor verbetering is. Het stimuleren van de therapietrouw dient bij beide interventietypen evenveel aandacht te krijgen. Alleen op deze manier zullen de verschillende interventietypen gerandomiseerd vergeleken kunnen worden en zal een duidelijke uitspraak gedaan kunnen worden over de mogelijkheid en/of een eventuele voorkeur voor een meervoudige- of enkelvoudige allergeen-reducerende interventie ter voorkoming van astma bij familiaal belaste kinderen.

## References

1. Blackman JA, Gurka MJ. Developmental and behavioral comorbidities of asthma in children. *J Dev Behav Pediatr* 2007;28:92-9.
2. Dahl R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Respir Med* 2006; 100:1307-17.
3. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child* 2000; 82(S2):II2-5.
4. van Gent R, van Essen LE, Rovers MM, Kimpen JL, van der Ent CK, de Meer G. Quality of life in children with undiagnosed and diagnosed asthma. *Eur J Pediatr* 2007;166:843-8.
5. van Schayck CP, Smit HA. The prevalence of asthma in children: a reversing trend. *Eur Respir J* 2005;26:647-50.
6. Bjerg-Backlund A, Perzanowski MS, Platts-Mills T, Sandstrom T, Lundback B, Ronmark E. Asthma during the primary school ages--prevalence, remission and the impact of allergic sensitization. *Allergy* 2006;61:549-55.
7. Hermann C, De Fine Olivarius N, Host A, Begtrup K, Hollnagel H. Prevalence, severity and determinants of asthma in Danish five-year-olds. *Acta Paediatr* 2006;95:1182-90.
8. Martinez FD. Complexities of the genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:S117-22.
9. Maas T, Dompeling E, Schayck van CP, Muris J, Schonberger H, Wesseling G, Platts-Mills TAE, Knottnerus JA.. Birth cohort studies on asthma development. *Pediatr Asthma, Allergy, Immunol* 2005; 18:201-15.
10. Kuiper S, Maas T, van Schayck CP, Muris JW, Schonberger HJ, Dompeling E, Gijsbers B, van Weel C, Knottnerus JA. The primary prevention of asthma in children study: design of a multifaceted prevention program. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:321-31.
11. Boner AL, Niero E, Antolini I, Valletta EA, Gaburro D. Pulmonary function and bronchial hyperreactivity in asthmatic children with house dust mite allergy during prolonged stay in the Italian Alps (Misurina, 1756 m). *Ann Allergy* 1985;54:42-5.
12. Platts-Mills TA, Tovey ER, Mitchell EB, Moszoro H, Nock P, Wilkins SR. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 1982;2:675-8.
13. Maas T, Kaper J, Sheikh A, Knottnerus JA, Wesseling G, Dompeling E, Muris JWM, van Schayck CP. Mono and multifaceted allergen reduction interventions for preventing asthma in children at high risk of developing asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2007.
14. Luczynska CM. Identification and quantification of mite allergens. *Allergy* 1998;53:54-7.
15. Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Champman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89: 1046-60.
16. Hill MR. Quantification of house-dust-mite populations. *Allergy* 1998;53:18-23.
17. Marks GB, Tovey ER, Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Variability and repeatability of house dust mite allergen measurement: implications for study design and interpretation. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1190-7.
18. Custovic A, Taggart SC, Niven RM, Woodcock A. Evaluating exposure to mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:134-5.
19. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989;299:1259-60.
20. (CVZ) CVZ. Immunoglobuline E (IgE) / Allergeen-specifiek IgE. In: Diagnostisch Kompas; 2003.

